

The Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of *Malus melliana* Ethanol Extract

Su Hyeon Lee¹, Kyong-Suk Jin¹, Byung Woo Kim^{1,2} and Hyun Ju Kwon^{1,2*}

¹Blue-Bio Industry Regional Innovation Center, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science & Human Ecology, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received January 5, 2017 / Revised February 3, 2017 / Accepted April 27, 2017

Malus melliana (Hand.-Mazz.) Rehder (*M. melliana*) is a Chinese plant that belongs to the Rosaceae family. There have been no previous reports regarding its bioactivity. In this study, the anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *M. melliana* ethanol extract (MMEE) were evaluated using a 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay, reactive oxygen species (ROS) scavenging activity assay, nitric oxide (NO) inhibitory activity assay, and the analysis of related protein expressions through Western blot hybridization. MMEE showed potent scavenging activity against DPPH, similar to ascorbic acid, a well-known anti-oxidative agent, which was used as a positive control. MMEE also inhibited hydrogen peroxide-induced ROS in RAW 264.7 cells. Moreover, MMEE induced the expression of an anti-oxidative enzyme, heme oxygenase 1, and its upstream transcription factor, nuclear factor E2-related factor-2, in a dose-dependent manner. On the other hand, MMEE was associated with a reduction in NO production, which was induced by the lipopolysaccharide treatment of RAW 264.7 cells. The expression of inducible nitric oxide synthase, which is the upstream regulator of NO production, was also inhibited. Taken together, these results suggest that MMEE has anti-oxidative and anti-inflammatory properties, thus appearing to be a potential anti-oxidant and anti-inflammatory agent. The further identification of active compounds that confer the biological activities of MMEE may be necessary.

Key words : Anti-inflammatory activity, anti-oxidative activity, *Malus melliana* ethanol extract

서 론

인체는 생명 유지에 필요한 에너지를 얻는 호흡과정을 통해 끊임없이 산소를 필요로 하며 호흡과정에서 흡입한 산소 중 일부(약 2-3%)는 활성 산소라는 유독한 물질로 전환되어 세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다[19]. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 체내 효소계, 환원대사, 물리적 또는 환경적 요인 등에 의해 끊임없이 생성되며 이들은 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의 세포성분들을 공격하여 산화적 손상을 유발시킨다[27]. 산화적 스트레스에 의한 ROS의 생성은 간 섬유화, 당뇨병 등의 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있으며, 특히 free radical (NO, OH, O₂)은 분자상 산소가 활성산소로 변하여 다른 분자들과 반응하면서 생성되어 노화, 염증, 암, 동맥경화의 발생과 직접 관련이 있는 것으로 알려져 있다[35, 37, 38]. 염증반응은 외부로부터 물리

적, 화학적 자극이나 세균감염에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나이며, 손상된 조직을 수복하거나 재생하려는 기전이다[39]. 그러나 만성으로 진행된 염증반응은 반대로 조직손상을 촉진하여 식도, 위, 대장, 방광 그리고 전립선 암으로의 진행을 유도하게 된다[7]. 이러한 관점에서 기능성 소재가 보유한 항산화능은 다양한 생리활성의 밑바탕이 되며 특히 산화적 스트레스와 염증에 의해 쉽게 발생하는 여러 가지 질환에 대응하기 위해서는 강한 항산화능을 보유한 생리활성 소재의 개발이 매우 중요하다. 이에 따라 최근 많은 연구들이 항산화 및 항염증 활성을 보유한 신소재 개발 및 그 활성 기전의 규명에 주력하고 있으며 특히 천연소재로부터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명하여 기능성 소재로서 활용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[14, 15, 26].

Heme oxygenase-1 (HO-1)은 Heme oxygenase 유도체중의 하나로 세포내의 Heme를 분해하여 부산물인 일산화탄소, 철, 빌리버딘을 만들며, 그 부산물과 함께 세포사멸 억제, 항염증 및 항산화 작용을 갖는 것으로 알려져 다양한 질병의 타겟으로 큰 주목을 받고 있다[17]. HO-1의 발현은 일차적으로 전사 단계에서 조절되며 전사인자 nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)에 의해 이루어진다고 알려져 있다[32]. 전사 인자로서의 Nrf2는 HO-1과 같은 항산화 단백질 유전자에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 이들 유전자

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1519, Fax : +82-505-182-6951

E-mail : hjkwon@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 발현과 단백질 생성을 항진시킴으로써 산화적 스트레스에 대한 생체방어기전의 핵심적 역할을 담당한다[3, 10].

염증반응에 관여하는 주요 세포 중 RAW264.7과 같은 대식세포는 그람 음성균의 세포외막에 존재하는 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)의 자극에 의해 염증매개성 cytokine의 분비를 촉진한다. 이러한 염증 매개 물질들의 형성은 nitric oxide (NO)의 대량 생성에 관여함으로써 염증매개에 큰 역할을 하며, 숙주에 치명적인 결과를 초래한다고 알려져 있다[13, 22]. 특히 inducible nitric oxide synthase (iNOS)는 외부 자극이나 염증매개성 cytokine 등에 의해 자극을 받게 되면 hepatocyte, smooth muscle cell, bone marrow cell, monocyte, macrophage 등 다양한 세포에서 발현되어 다량의 NO를 생산하는데, 과도한 NO의 생성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 유발한다[16, 30].

*Malus melliana*는 장미과(Rosaceae)에 속하는 목본성 식물로서 대략 5 m 높이까지 자라며 25 내지 40 mm 직경의 열매를 맺는다. 현재 *M. melliana*의 DPPH 라디칼 소거능[8]에 대해서는 보고된 바 있으나 관련 기작 및 생리활성에 대해서 알려진 바가 없으며, 특히 세포수준에서의 항산화 및 항염증 효과에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 천연에서 유래한 생리활성 보유 신소재 개발의 일환으로 *M. melliana* 95% 에탄올 추출물(MMEE)이 보유한 항산화 및 항염증 활성을 분석함으로써 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

M. melliana 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 *M. melliana* 95% 에탄올 추출물(이하 MMEE)은 한국생명공학연구원, 해외생물소재허브센터에서 구입(분양번호 FBM123-003)하여 사용하였으며 그 추출 과정은 다음과 같다. 건조 및 분쇄한 MMEE를 95% 에탄올을 이용하여 45°C에서 15분간 초음파 추출(sonication) 후 2시간 정지시키는 과정을 하루 10회씩 반복하여 총 3일간 추출을 수행하였다. 추출이 끝난 시료를 여과지에 걸러 고형물을 없애고 45°C에서 감압농축(N-1000SW, EYELA, Tokyo, Japan)한 후 동결 건조(FDU2100, EYELA, Tokyo, Japan)하여 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 측정

DPPH는 그 자체가 매우 안정한 자유라디칼로 520 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 진한 보라색의 화합물이며 라디칼 소거활성이 있는 항산화제에 의해 정량적으로 탈색됨으로 항산화 활성을 쉽게 측정할 수 있다. 이 라디칼에 의한 소거활성은 지질과산화 억제활성을 비롯한 항산화 활성과 상관관계

를 보이므로 항산화제 검색에 널리 이용되고 있다[5, 33].

DPPH 라디칼 소거능 측정을 위해 MMEE를 농도(0.1024-12.8 µg/ml) 별로 메탄올에 녹여 준비하고 96 well plate에 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M DPPH 40 µl와 각 시료 160 µl를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, multi-plate reader (Paradigm, Beckman, Brea, CA, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 대비하여 자유라디칼 소거 정도를 백분율로 나타내고, 50% 소거 농도(Inhibitory Concentration, IC₅₀)를 계산하였다. 대표적인 항산화제로 DPPH 라디칼 소거능 측정 시 양성 대조군으로 주로 사용되는 아스코르빈산을 함께 비교 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

RAW 264.7 쥐 대식세포주의 배양

항산화 및 항염증 활성의 세포 실험 모델계로 쥐 대식세포주인 RAW 264.7을 American Type Tissue Collection (ATCC®, TIB-71™, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) 및 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다 [28].

MMEE의 세포 독성 유무 분석

활성 분석 수행 전 시료가 세포생존율에 미치는 영향을 확인하고, 세포 독성을 유발하지 않는 시료의 처리 농도를 결정하기 위해 MMEE에 의한 세포 독성 유발 유무를 WST assay를 통해 분석하였다. WST는 수용성 tetrazolium 염으로서 살아 있는 세포와 반응하여 수용성 formazan을 생성하는데, 시료 자체의 세포 독성이 낮고 측정값의 유의성 높아 최근 많이 이용되고 있는 방법이다[6, 24]. 3.0×10^5 cell을 24-well tissue culture plate에 분주하여 24시간 동안 부착시키고, MMEE 처리 24시간 경과 후 WST 시약(Daeil Lab Service, Daejeon, South Korea)이 든 배지로 교체하여 한 시간 동안 37°C에서 반응시킨 다음 multi-plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었으며 독성을 유발하지 않는 농도 범위에서 이후 실험을 수행하였다.

MMEE의 활성산소종(ROS) 소거능 분석

ROS는 세포 내 DNA의 변형, 단백질 산화, 지질과산화 등을 일으켜 암, 당뇨병, 동맥경화, 염증 등의 다양한 질병을 유발하고, 염증 및 노화의 진행을 가속화 시키는 원인이 되므로 ROS 소거능은 항산화능의 중요한 지표로 활용된다[1, 4]. H₂O₂는 대표적인 ROS 중 하나로 소재의 항산화능을 규명하기 위한 많은 연구에서 ROS 유도제로 사용되고 있다[28, 29, 31]. 본 연구에서는 MMEE가 보유한 항산화능을 H₂O₂로 유도

한 ROS 생성에 시료가 미치는 영향을 통해 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 세포주에 세포 침투성 형광 염료인 50 μM의 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 2시간 동안 전 처리한 후 제거하고 0.5 mM의 H₂O₂와 농도 별 시료를 함께 처리한 후 시료의 ROS 생성 억제능의 정도를 multiplate reader를 이용한 형광 측정을 통해 분석하였다. 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

항산화 효소 HO-1 및 상위전사인자 Nrf2의 발현 조절능 분석

MMEE의 항산화 활성 기전을 알아보기 위해 대표적인 항산화 효소인 HO-1과 그 상위전사인자인 Nrf2의 시료 처리에 의한 단백질 발현 변화를 Western blot hybridization으로 분석하였다. HO-1의 일차항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였고, Nrf2와 actin의 일차항체와 anti-goat와 anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology (Paso Robles, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후, 50 μg의 단백질을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1,000-5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 혼성화하였다. Membrane 수세 후 horse radish peroxidase (HRP)가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 화학발광검출법(chemiluminescence detection system, FluoChem@ FC2, AlphaInnotech, San Jose, CA, USA)을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 데이터를 제시하였다.

MMEE의 NO 생성 억제능 분석

NO는 자유라디칼의 일종으로 세포에서 중요한 2차 전달자 역할을 담당하고 있으며, 세포막을 쉽게 통과할 수 있는 성질이 있어 생체 내에서 매우 다양한 작용을 하나 과잉 생산 시 산화적 스트레스의 유발을 통해 염증 및 세포 손상의 원인이 된다[21, 18]. 이러한 NO 생성 억제능의 분석은 Park 등[28]의 방법을 변형하여 수행하였다. RAW 264.7 세포주를 24-well tissue culture plate에 well 당 3.0×10⁵ 개씩 분주하여 부착시킨 후 1 μg/ml의 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도하고 CPEE에 의한 NO 생성 저해능을 Griess reaction을 통해 분석하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다. 실험에 사용한 시약은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

MMEE의 항염증 활성 관련 단백질 발현 조절능 분석

MMEE의 항염증 활성 기전을 밝히기 위해 NO 생성의 핵심 단백질인 iNOS의 단백질 발현을 Western blot hybridization으로 분석하였다. iNOS의 일차항체는 Cell Signaling Technology로부터 구입하였고, Actin의 일차항체와 anti-goat와 anti-rabbit 등의 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하여 사용하였다. 시료 처리가 끝난 배양 세포에서 단백질을 추출하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정한 후, 50 μg의 단백질을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 blotting한 후 1:1,000-5,000으로 희석한 대상 단백질의 일차항체와 혼성화하였다. Membrane 수세 후 HRP가 부착된 이차항체(1:1,000)로 한 시간 동안 반응시키고 화학발광검출법을 이용하여 단백질 발현을 분석하였다. 3회 반복 실험을 통해 유의적인 단백질 발현 변화를 확인한 후 데이터를 제시하였다.

통계 분석

실험의 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었고, 각 데이터의 통계 분석은 SPSS 20.0 software를 이용한 unpaired Student's *t*-test를 통해 *p* 값이 0.05 미만(*p*<0.05)인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

MMEE의 라디칼 소거 활성 측정능을 통한 항산화능 분석

천연 소재에 다량 함유되어 있는 페놀성 화합물은 항산화제로 많이 응용되고 있는데 이러한 페놀성 화합물의 항산화제는 과산화지질에 수소공여체로 작용하여 연쇄반응을 종결시키게 된다[2, 11]. 먼저 MMEE의 항산화능 보유 유무 및 그 정도를 알아보기 위해 항산화능의 주요 지표 중 하나인 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다. 그 결과 0.1024, 0.512, 2.56, 12.8 μg/ml의 MMEE에 의해 DPPH 라디칼 소거능의 정도가 각각 29.43, 35.87, 62.64, 98.31%로 나타나 MMEE가 농도의존적인 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다(Table 1). MMEE에 의한 50% 라디칼 소거 농도를 나타내는 IC₅₀ 값은 1.59 μg/ml로 양성 대조구로 사용한 아스코르빈산, 즉 비타민 C의 IC₅₀ 값인

Table 1. DPPH radical scavenging activity of MMEE

Reagent	Concentration (μg/ml)	Scavenging activity (%)
MMEE	0.1024	29.43±1.87
	0.512	35.87±1.83
	2.56	62.64±1.78
	12.8	98.31±0.13
Ascorbic acid (Positive control)	0.512	31.90±0.02
	2.56	96.47±0.13
	12.8	98.41±0.17

1.09 µg/ml와 유사한 정도의 활성을 보였다. 이에 MMEE가 보유한 항산화능의 정도 및 기전을 세포 수준에서 확인하고자 하였다.

MMEE가 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향

MMEE가 보유한 항산화능을 세포 수준에서 확인하기 위해 MMEE가 세포 실험 모델체인 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴보았다. MMEE를 농도별(0, 10, 25, 50 µg/ml)로 24시간 처리한 결과, 모든 농도에서 세포 독성을 유발하지 않는 것을 확인하였다(Fig. 1). 이후 진행 된 항산화능 기전분석에서는 10-50 µg/ml까지의 농도를 사용하였다.

MMEE의 ROS 소거능 분석

세포 내로 유입된 DCF-DA는 세포 내에서 생성된 자유라디칼과 반응하여 DCF로 산화되는데 이때 발생하는 형광의 양을 통해 ROS 생성 정도를 측정한다[20]. DPPH 라디칼 소거능 분석에 의해 MMEE가 강한 항산화능을 보유한 소재임이 확인됨에 따라 그 작용 기전을 좀 더 자세히 알아보기 위해 먼저 RAW 264.7 세포주에 대표적인 산화적 스트레스 유도인자인 H₂O₂를 처리하여 MMEE에 의한 ROS 소거능을 분석하였다. 그 결과 H₂O₂에 의해 유도된 ROS 생성이 MMEE의 처리에 의해 농도의존적으로 저해되었다(Fig. 2). 이를 통해 MMEE가 DPPH 라디칼 뿐만 아니라 세포 수준에서 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 또한 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.

MMEE가 항산화 효소 HO-1 및 상위 전사인자 Nrf2의 발현에 미치는 영향

HO-1은 산화적 스트레스에 대응하는 주요한 방어효소로 여러 세포 유형에서 생존이나 스트레스 반응과 관련된 신호전달 경로를 통해서 주로 전사수준에서 조절된다[13, 34]. 전사인자인 Nrf2는 HO-1의 발현에 가장 중요한 역할을 한다[36]. 정상적인 상태에서 Nrf2는 Keap1에 의해 비활성화 상태로 세포

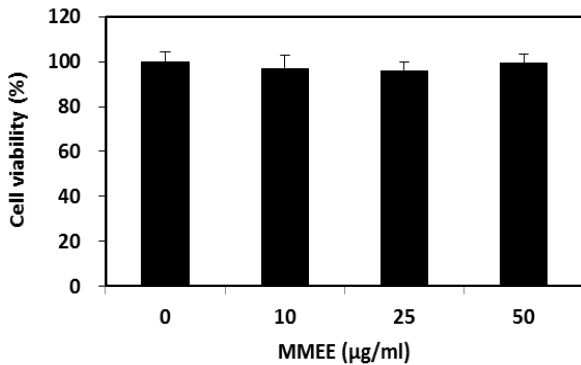


Fig. 1. Effect of MMEE on cell viability in RAW 264.7 cells. Cells were treated with the indicated concentration of MMEE for 24 hr and viability was determined by WST assay. Values are represented as the mean ± SD (n=3).

질에 존재하지만, 산화적 자극을 받으면 Keap1과 해리되어 핵 내로 이동하여 ARE에 결합함으로써 HO-1과 같은 항산화 효소의 발현을 조절한다[25]. 상기 실험에서 MMEE에 의해 ROS가 감소되는 것이 확인됨에 따라 MMEE가 보유한 항산화능의 작용 기작을 알아보기 위해 HO-1 및 Nrf2의 발현 정도를 Western blot hybridization을 통해 분석하였다. 10-50 µg/ml의 시료를 6시간 동안 처리한 후 단백질의 발현을 분석한 결과 Fig. 3에 제시된 바와 같이 HO-1의 발현이 농도의존적으로 증가되었으며, 특히 25 µg/ml 이상에서 강한 증가를 보였다. 뿐만 아니라 HO-1의 상위 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현

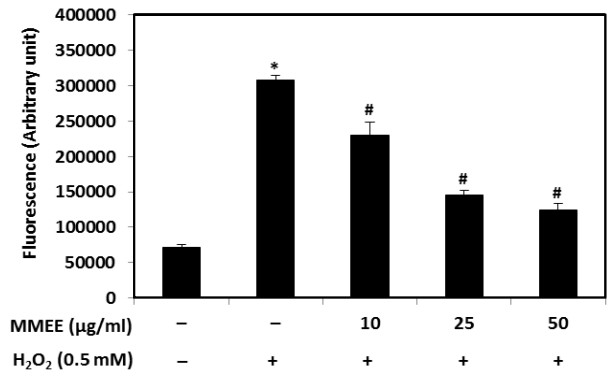


Fig. 2. ROS scavenging activity of MMEE in RAW 264.7 cells. ROS scavenging activity of MMEE against H₂O₂ was analyzed using a cell permeable probe, DCF-DA. Values are represented as the mean ± SD (n=3). *, #Significantly different from the vehicle control (-/-) and H₂O₂-induced control (-/+), respectively (p<0.05).

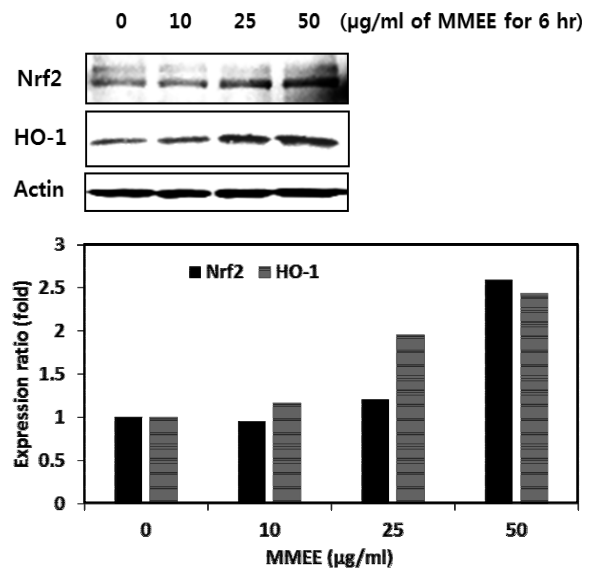


Fig. 3. Modulation of the representative anti-oxidative enzyme, HO-1 and its upstream transcription factor Nrf2 protein expression in RAW 264.7 cells by MMEE. Protein expression was analyzed by Western blot hybridization. Actin was used as an internal control.

또한 농도의존적으로 증가됨을 보여 HO-1의 발현 변화와 유사하게 나타났다. 이러한 결과를 통해 MMEE의 항산화능이 HO-1의 발현 유도를 통해 나타나며, HO-1의 발현 유도는 Nrf2의 발현에서 기인할 것으로 판단되었다.

CPEE가 NO 생성 및 iNOS 발현에 미치는 영향

생체 내에서 NO는 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. 염증반응은 숙주 방어 시스템에서 LPS와 같은 염증성 물질에 의해 활성화된 대식세포가 염증매개성 cytokine의 주요 매개체를 대량으로 생산하는 것으로 알려져 있다[9]. iNOS는 LPS와 같은 염증 유발인자의 자극으로 장시간 대량의 NO를 생성하는데, 다량 생성된 NO는 과도한 염증과 조직 손상을 유발하므로 NO 생성 저해능 측정은 항염증 활성의 지표로 활용되고 있다[23]. MMEE가 강한 항산화 활성을 보유하고 있음이 상기의 실험을 통해 밝혀짐에 따라 MMEE가 항염증 활성 또한 나타내는지 알아보기 위해 NO 생성 저해능을 분석하였다. 먼저 MMEE가 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7의 세포생존율에 미치는 영향을 알아본 결과 10-200 µg/ml의 시료 처리에 의해 강한 세포독성은 유발되지 않았으나, 농도의 증가에 따라 세포증식이 약하게 억제되어 150, 200 µg/ml의 처리에서는 각각 77.1%, 66.2%의 세포생존율을 보였다(Fig. 4A). 다음으로 LPS로 자극을 유도한 RAW 264.7 세포주에서 농도별 MMEE의 처리에 따른 NO 생성과 iNOS 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 10-200 µg/ml의 시료 처리에 의해 농도의존적인 NO 생성 저해활성과 함께 iNOS 발현이 저해됨을 확인 하였다(Fig. 4B, Fig. 4C). 한편 세포 생존율이 77.1, 66.2%로 나타난 150, 200 µg/ml의 시료 처리군에서는 NO 생성량의 감소가 세포 독성에서 기인하는 것으로 판단할 가능성이 있으나, 현미경 관찰 시 강한 세포 독성을 보이지 않았고 시료 처리 농도 증가에 따른 세포 증식 저해능을 보이는 것으로 판단되었다. 또한 저농도에서부터 이미 시료 처리에 의한 농도 의존적인 NO 생성 저해능과 iNOS 단백질 발현의 감소가 관찰되었고 이는 동일한 단백질 양을 적용한 고농도에서도 지속적인 발현 감소를 보여 유의적인 활성을 가지는 것으로 판단하였다. 이러한 결과를 통해 MMEE가 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 조절할 수 있는 항염증 활성을 보유한 것으로 사료된다. 또한 고농도 처리시의 세포 생존을 저하 및 200 µg/ml 이상의 시료 처리시 독성 유발 유무에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

이상의 결과를 통해 MMEE가 강한 항산화능과 항염증 활성을 보유함을 세포 수준에서 처음으로 확인하였으며, 이러한 결과는 신규 소재에 대한 새로운 기능성 데이터를 구축함과 동시에 향후 생리활성 보유 기능성 소재로서의 활용을 위한 근거자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 지속적인 연구를 통해 MMEE가 보유한 다양한 생리활성 및 그 기저 메커니즘을 밝힘과 동시에 활성 성분의 분리·규명 또한 필요

할 것으로 생각된다.

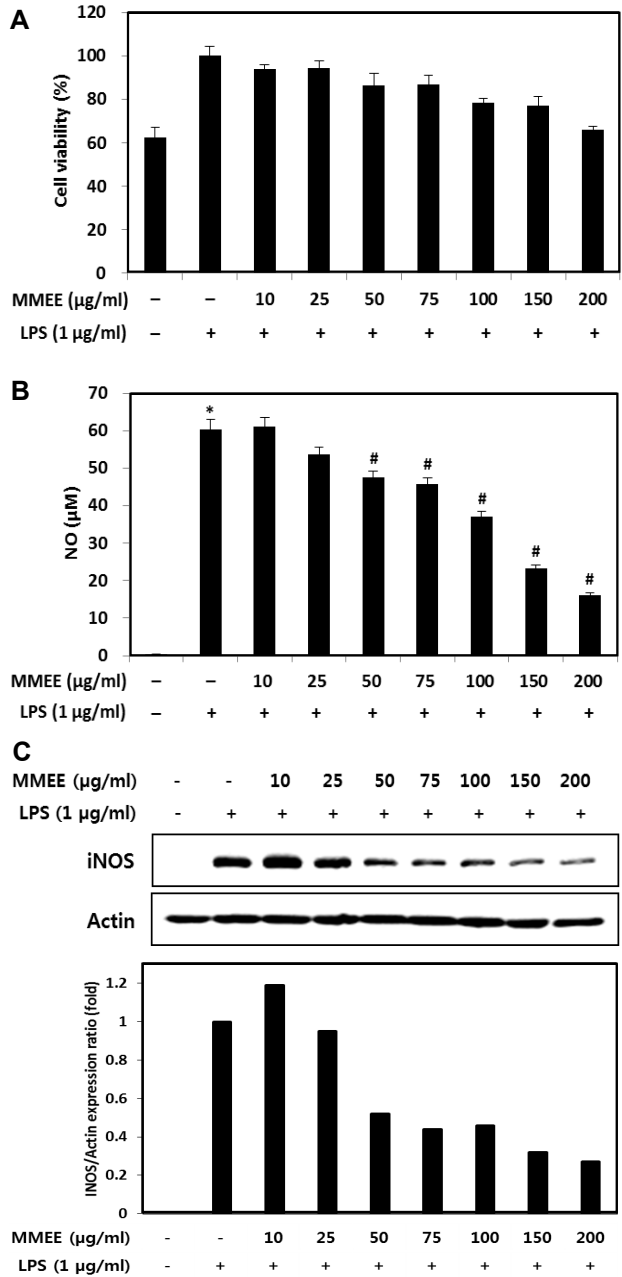


Fig. 4. Effect of MMEE on cell viability (A), LPS-induced NO formation (B), and iNOS protein expression (C) in RAW 264.7 cells. (A) Cells were treated with the indicated concentration of MMEE with or without LPS for 24 hr, and viability was determined by WST assay. (B) Modulation of LPS-induced NO formation by MMEE was analyzed by Griess reaction. (C) iNOS protein expression was analyzed by Western blot hybridization. (A, B) Values are represented as the mean ± SD (n=3). *, #Significantly different from the vehicle control (-/-) and LPS-induced control (-/+), respectively (p<0.05). (C) Actin was used as an internal control.

감사의 글

이 연구는 2017학년도 동의대학교 교내연구비(2017029300 01)와 산업통상자원부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업(RIC08-06-07) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 이루어졌습니다.

References

- Ames, B. N., Shingenaga, M. K. and Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7915-7922.
- Azuma, K., Nakayama, M., Koshica, M., Lppoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Ito, H. and Higashio, H. 1999. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3963-3966.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C. J., Foresti, R., Alam, J. and Motterlini, R. 2003. Curcumin activates the heme oxygenase-1 gene *via* regulation of Nrf2 and the antioxidant responsive element. *Biochem. J.* **371**, 887-895.
- Beckman, K. B. and Ames, B. N. 1979. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605.
- Gonzalez-Burgos, E. and Gomez-Serranillos, M. P. 2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. *Curr. Med. Chem.* **19**, 5319-5341.
- Guertler, A., Kraemer, A., Roessler, U., Hornhardt, S., Kulka, U., Moertl, S., Friedl, A. A., Illig, T., Wichmann, E. and Gomolka, M. 2011. The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals. *Radiat. Prot. Dosimetry* **143**, 487-490.
- Hofseth, L. J. and Ying, L. 2006. Identifying and defusing weapons of mass inflammation in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1765**, 74-84.
- Hu, F. and Lu, R. 2004. Studies on scavenging activities to DPPH free radical of extracts from fresh leaves of some woody plants of Rosaceae. *Chinese Bull. Botany* **21**, 74-78.
- Hwang, S. M., Chen, C. H., Chen, S. S. and Chen, J. C. 2000. Chitinous materials inhibit nitric oxide production by activated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 229-233.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M. and Nabeshima, Y. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313-322.
- Jo, N. R., Park, C. I., Park, C. W., Shin, D. H., Hwang, Y. C., Kim, Y. H. and Park, S. N. 2012. Cellular protective effects of peanut sprout root extracts. *Chem. Eng.* **23**, 183-189.
- Kim, B. W., Kim, J. I., Kim, H. R. and Byun, D. S. 2014. Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoi* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **47**, 527-536.
- Kim, D. H., Park, S. J., Jung, J. Y., Kim, S. C. and Byun, S. H. 2009. Anti-inflammatory effects of the aqueous extract of Hwangnyeonhaedok-tang in LPS activated macrophage cells. *Kor. J. Herbology* **24**, 39-47.
- Kocanova, S., Buytaert, E., Matroule, J. Y., Piette, J., Golab, J., de Witte, P. and Agostinis, P. 2007. Induction of hemeoxygenase 1 requires the p38MAPK and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. *Apoptosis* **12**, 731-741.
- Kundu, J. K. and Surh, Y. J. 2008. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutat. Res.* **659**, 15-30.
- Lee, K. H., Nam, H. O. and Yoon, W. H. 2007. Effect of protein-bond polysaccharide isolated from *Acanthopanax senthapanax* in reducing the toxic effect of cisplatin. *Kor. J. Pharmacogn.* **38**, 1-17.
- Lee, M. S., Lee, J., Kwon, D. Y. and Kim, M. S. 2006. Ondamtangamibang protects neurons from oxidative stress with induction of heme oxygenase-1. *J. Ethnopharmacol.* **108**, 294-8.
- Lee, S. C., Kim, D. H. and Lee, H. W. 1998. Roles of nitric oxide in the ultraviolet B-induced inflammatory response of the mouse skin. *Kor. J. Invest. Dermatol.* **5**, 127-132.
- Lee, S. O., Kim, M. J., Kim, D. K. and Choi, H. J. 2005. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *Kor. J. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 139-147.
- Lim, N. K., Lee, D. S., Yeo, S. H., Kim, Y. C. and Jeong, G. S. 2012. Involvement of heme oxygenase-induction in the neuroprotective activity of extract of *Siegesbeckia herba* in murine hippocampal HT22 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **43**, 316-322.
- Lowenstein, C. J. and Snyder, S. H. 1992. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707.
- McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A. and Corbett, J. A. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**, 24-32.
- Nathan, C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
- Ngamwongsatit, P., Banada, P. P., Panbangred, W. and Bhunia, A. K. 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxicogenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J. Microbiol. Methods* **73**, 211-215.
- Nguyen, T., Huang, H. C. and Pickett, C. B. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J. Biol. Chem.* **275**, 15466-15473.
- Noworyta-Sokolowska, K., Gorska, A. and Golembiowska, K. 2013. LPS-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat striatum. *Pharmacol. Rep.* **65**, 863-869.
- Papa, S. and Skulachev, V. P. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.* **174**, 305-319.
- Park, C. M., Park, J. Y., Noh, K. H., Shin, J. H. and Song, Y. S. 2011. *Taraxacum officinale* Weber extracts inhibit LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production *via* the

- NF-kappaB modulation in RAW 264.7 cells. *J. Ethnopharmacol.* **133**, 834-842.
29. Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**, 17-34.
 30. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. and Freeman, B. A. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **266**, 4244-4250.
 31. Saw, C. L., Wu, Q., Su, Z. Y., Wang, H., Yang, Y., Xu, X., Huang, Y., Khor, T. O. and Kong, A. N. 2013. Effects of natural phytochemicals in *Angelica sinensis* (Danggui) on Nrf2-mediated gene expression of phase II drug metabolizing enzymes and anti-inflammation. *Biopharm. Drug Dispos.* **34**, 303-311.
 32. Shan, Y., Lambrecht, R. W., Donohue, S. E. and Bonkovsky, H. L. 2006. Role of Bach1 and Nrf2 in up-regulation of the heme oxygenase-1 gene by cobalt protoporphyrin. *FASEB J.* **20**, 2651-2653.
 33. Shin, D. C., Kim, G. C., Song, S. Y., Kim, H. J., Yang, J. C. and Kim, B. A. 2013. Antioxidant and antiaging activities of complex supercritical fluid extracts from *Dendropanax morbifera*, corni fructus and lycii fructus. *Kor. J. Herbology* **28**, 95-100.
 34. Soo, Y. B., Song, J. S., Moon, H. I. and Kim, Y. H. 2015. Effects of achyranthoside C dimethyl ester on heme oxygenase-1 expression and NO production. *J. Life Sci.* **25**, 976-983.
 35. Sranely, M., Princem, P. and Men, V. P. 2001. Antioxidant action of *Tinospora cordifolia* root extract in alloxan diabetic rats. *Phytither. Res.* **15**, 213-217.
 36. Srisook, K., Kim, C. and Cha, Y. N. 2005. Molecular mechanisms involved in enhancing HO-1 expression: de-repression by heme and activation by Nrf2, the "one-two" punch. *Antioxid. Redox. Signal.* **7**, 1674-1687.
 37. Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefr-Szerszen, M. 2001. Alcohol-related cirrosis with pancreatitis. The role of oxidative stress in the progression of the disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **49**, 19-22.
 38. Young, I. S. and McEneny, J. 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 358-361.
 39. Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T. R. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* **6**, 347-373.

초록 : *Malus melliana* 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 활성

이수현¹ · 진경숙¹ · 김병우^{1,2} · 권현주^{1,2*}

(¹동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화 지원센터, ²동의대학교 생명융용학과)

Malus melliana (Hand.-Mazz.) Rehder (*M. melliana*)는 장미과에 속하는 중국 자생 식물 중 하나로 현재까지 보고된 생리활성은 전무하다. 본 연구에서는 *M. melliana* 에탄올 추출물(MMEE)의 항산화 및 항염증 생리활성을 DPPH 라디칼 소거능, ROS 소거능, NO 생성 저해능 및 Western blot hybridization을 통한 연관 단백질 발현 분석을 통해 평가하였다. MMEE의 항산화능을 DPPH 라디칼 소거능을 통해 분석한 결과 양성 대조군으로 사용한 대표적인 항산화제인 아스코르빈산과 유사한 정도의 높은 소거활성을 보여 MMEE가 매우 강한 항산화능을 보유함을 확인하였다. 또한 RAW 264.7 세포주에서 H₂O₂에 의해 유도된 ROS에 대한 MMEE의 소거능을 분석한 결과, 농도의존적인 강한 ROS 소거능을 보였다. 뿐만 아니라 대표적인 항산화 효소인 HO-1 및 그 전사 인자인 Nrf2의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 MMEE에 의해 HO-1 및 Nrf2의 발현이 증가됨을 보였다. 한편 MMEE가 LPS에 의해 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 분석한 결과 농도의존적인 NO 생성 저해능을 보였으며 이는 NO 생성 단백질인 iNOS의 발현 저해에서 기인함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 MMEE의 높은 항산화능과 항염증 활성을 확인하였으며 향후 잠재적인 기능성 소재로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 추후 계속적인 연구를 통해 활성 물질의 규명이 필요할 것으로 판단된다.